

## **Especialización en Nutrición Animal**

### **Facultad de Ciencias Veterinarias- Universidad Nacional de La Plata**

#### **“Evaluación de las zincemias en terneros con infección respiratoria experimental por *Mannheimia haemolytica*”**

**Autor:** Galarza Esteban Med. Vet.

**Director:** Fazzio Luis E. Med. Vet., Dr Cs.Vet.

#### **INTRODUCCIÓN**

El zinc (Zn) es un mineral esencial en el crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos, donde cumple un rol catalítico, estructural y regulatorio en la actividad celular de los mamíferos (Rosa et al., 2008). El Zn forma parte de más de 300 metaloenzimas y 900 factores de activación de la transcripción del genoma, lo que da idea de la importancia de este mineral en la homeostasis animal y humana (Tapiero and Tew, 2003). Por esta razón, la carencia de Zn en bovinos genera consecuencias variadas e inespecíficas, entre las que se mencionan disminución en la ganancia diaria de peso (Rosa et al., 2008), caída del consumo y de la eficiencia de conversión alimenticia (Underwood and Suttle, 1999), fallas inmunológicas (Kincaid et al., 1997) y disminución en la eficiencia reproductiva (Sekler et al., 2007; Picco et al., 2010).

La homeostasis del Zn es compleja y sólo parcialmente conocida, este mineral no posee un órgano de almacenamiento que le permita mantener sus niveles normales ante una eventual disminución en su consumo. Sin embargo, se considera que hay pequeñas reservas que amortiguan un desbalance en todas las células, que incluyen el Zn plasmático, el Zn unido a metalotioneína, como también el Zn que se encuentra dentro de organelas, entre ellas el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (King, 2011).

Cuando el consumo de Zn por parte del animal es menor al requerido, se limitan las pérdidas endógenas y aumenta la eficiencia de absorción (King et al., 2001). Estos mecanismos están muy bien regulados por dos familias de transportadores. Uno de ellos corresponde a los *Zinc Transporter* (ZnT), que disminuyen la concentración citoplasmática de Zn, ya sea porque lo transfiere al líquido extracelular o porque lo introduce a distintas organelas. El segundo grupo corresponde a la familia ZIP, que aumentan la concentración

citoplasmática de Zn introduciéndolo desde el líquido extracelular o sacándolo de las organelas donde se acumula (Cousins et al., 2006).

Si bien no hay marcadores sensibles del *status* de Zn, el más utilizado es la zincemia (concentración de Zn en suero o plasma) (Underwood y Suttle, 1999). Existe un acuerdo en considerar normal a valores de zincemia por encima de 90 µg/dl mientras que valores menores a 80 µg/dl indicarían carencia, dejando entre ambos un rango marginal (Enjalbert et al., 2006). Sin embargo la zincemia suele ser un marcador inestable y puede variar sin tener consecuencias para el animal (Rosa et al., 2008). En roedores, se menciona que la zincemia desciende ante una inflamación, trauma, infección o estrés, como parte de la respuesta de fase aguda (Lichten and Cousins, 2009; Aydemir et al., 2012; Aburto-Luna et al., 2017). En bovinos, al momento, se conoce poco sobre las variaciones de zincemia ante situaciones estresantes y/o de enfermedad.

La enfermedad respiratoria bovina (ERB) es la principal causa de muerte en explotaciones de engorde a corral (Galvan et al., 2014) y la segunda en importancia en terneros en explotaciones extensivas de cría (Costa et al., 2004). Si bien la ERB es producto de una compleja interacción entre estrés, virus y bacterias (Fazzio et al., 2010-a); es ampliamente aceptado que *Mannheimia haemolytica* (MH) cumple un rol determinante en la fisiopatogenia de la enfermedad (Rice et al., 2007). En estudios previos, se observaron variaciones de la zincemia en terneros desafiados experimentalmente con el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y en animales que padecían ERB crónica (Orr et al., 1990, Soltesova et al., 2015). Sin embargo, no hay estudios realizados en terneros con infecciones respiratorias agudas de origen bacteriano donde se evalúen zincemias.

La hipótesis de trabajo es que la infección con MH disminuye la zincemia. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de infección experimental por MH sobre la zincemia en terneros.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Todos los procedimientos realizados en el presente ensayo fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata. Registrado en el Protocolo para el Uso de Animales de Investigación Científica (Identificación interna N° 55-2-16P).

### *Lugar de trabajo y Animales*

Para la comprobación de mi hipótesis de trabajo se realizó un estudio experimental, llevado a cabo en el Hospital Escuela de Grandes Animales de la FCV-UNLP, el cual incluyó 11 terneros machos (unidades experimentales), raza Holando Argentino de entre 15 y 20 días de vida.

#### *Alojamiento y alimentación*

Los terneros provinieron de un establecimiento de la zona y fueron alojados durante la noche en boxes grupales (4 animales/box) de piso de cemento con cama de paja y siendo transferidos a un potrero alledaño con sistema de estaca individual durante el día. Los animales recibieron un suministro de 4 litros de sustituto lácteo por día, el cual fue dividido en dos entregas de 2 litros cada una (AM- PM) en balde. Al final de cada entrega se registró el volumen remanente para medir consumo de sustituto lácteo. Además se les suministró alimento balanceado *ad libitum* y se midió el consumo en gramos al final de cada día durante todo el ensayo.

#### *Evaluación clínica e infección experimental*

Antes de comenzar con la etapa de muestreo, se realizó el examen clínico general de los 11 terneros incluidos en el presente ensayo, los cuales fueron considerados como sanos.

Todos los terneros fueron inoculados con una cepa de campo de MH (Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico, FCV- UNLP), momento que fue considerado como DIA 0. La concentración del inóculo fue ajustado a la escala 0,5 del método nefelométrico de Mac Farland, con un conteo viable final de  $3 \times 10^8$  UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ mililitro de inóculo bacteriano). Los terneros recibieron 6 ml de inóculo más 5 ml de solución fisiológica estéril por vía intratraqueal (Coutinho et al., 2009). Luego de la inoculación se realizaron evaluaciones clínicas hasta el momento de la aparición de signos clínicos específicos de ERB.

#### *Criterio de tratamiento*

Se registraron parámetros para clasificar como enfermo a aquellos animales que alcanzaron el grado 3 de la escala propuestas por Hanzlicek (2010), quien utiliza la observación/medición de temperatura corporal rectal, frecuencia respiratoria, patrón respiratorio, secreciones nasales y secreciones oculares para clasificar a los animales en cuatro grados; grado 1, clínicamente sano; grado 2, levemente enfermo; grado 3,

moderadamente enfermo; grado 4, severamente enfermo. Cuando los terneros alcanzaron el criterio de enfermo (grado 3) recibieron un único tratamiento con tilmicosina por vía subcutánea a la dosis de 10 mg/kg de peso vivo (Maxitil® Biogénesis- Bagó).

#### *Criterio de alta*

Una vez realizado el tratamiento los animales fueron evaluados diariamente hasta alcanzar el alta clínica. La misma se realizó cuando todos los parámetros evaluados se encontraron dentro del rango considerado fisiológico.

#### *Muestras de sangre*

Se tomaron muestras de sangre seriadas en el tiempo, en relación al día de inoculación (DIA 0), los días -6, -1, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10. La extracción se realizó por punción yugular. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos plásticos de 10 ml previamente lavados con detergente no-iónico y ácido nítrico, con EDTA como anticoagulante. El procesamiento de las muestras, conservadas a 4°C, se realizó dentro de los 60 minutos post extracción. A partir del sobrenadante obtenido de la desproteinización del plasma sanguíneo con ácido tricloracético al 10% (p/v), se midió la concentración de Zn por espectrofotometría de absorción atómica de llama (AAAnalyst 200 – Perkin Elmer).

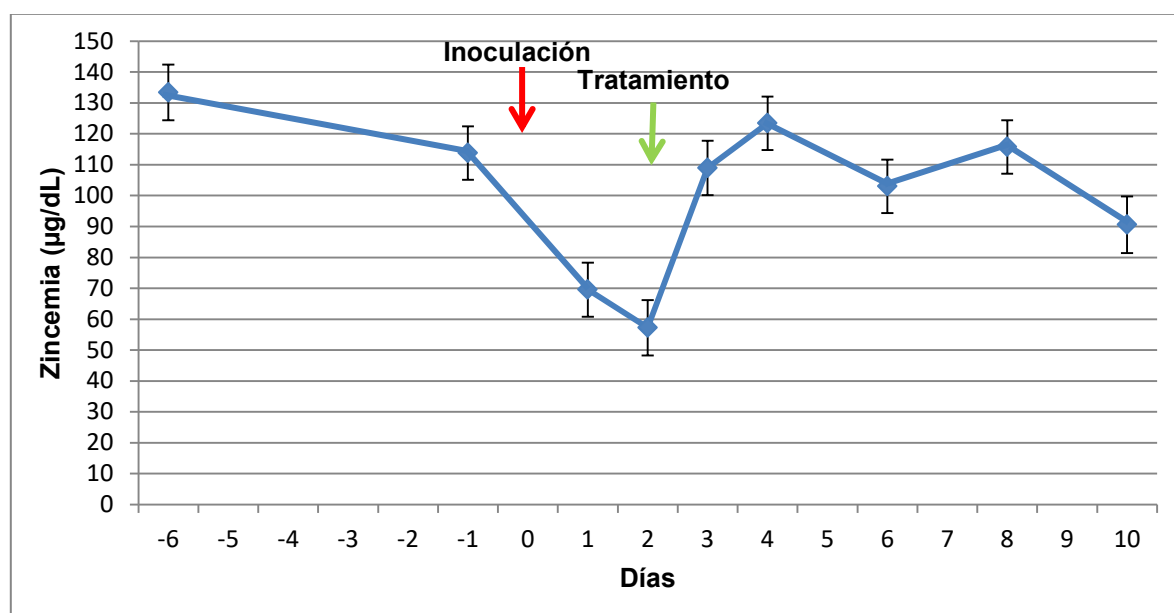
#### *Análisis estadístico*

Para explicar la variabilidad observada en la zincemia se ajustó un modelo de regresión lineal múltiple con medidas repetidas en el tiempo utilizando el ProcMixed de SAS (9.4). El modelo incluyó como predictor categórico a los puntos en el tiempo en el cual se realizaron los muestreos (DÍA= -6,-1, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10) y como predictores continuos al consumo de leche en mililitros (mL) y al consumo de alimento en gramos (g). Se empleó el criterio de Simetría Compuesta para definir la estructura de correlación entre los diferentes muestreos de un mismo individuo. Los valores de zincemia para los diferentes niveles de la variable DÍA se expresan como Cuadrados Mínimos Medios (CMM) y se estimó la significación de las diferencias de CMM entre todos los niveles de la variable DIA ( $p \leq 0.05$ ). Finalmente se utilizó un contraste ortogonal para evaluar el efecto del tiempo sobre la zincemia.

## **RESULTADOS**

Todos los animales incluidos en el presente ensayo se encontraban clínicamente enfermos (grado 3) a los 2 días post inoculación experimental con MH. De las variables incluidas como predictores de la zincemia, solo el tiempo (DÍA) resultó estadísticamente significativo, ( $p \leq 0.001$ , Figura 1). En el día 2 post inoculación las zincemias cayeron de 113.8 a 57.2  $\mu\text{g/dL}$  ( $P < 0.001$ ). El tiempo tuvo un efecto cúbico sobre a zincemia ( $P < 0.001$ ). Después del tratamiento antibiótico se incrementaron a 109.0  $\mu\text{g/dL}$ . Además, el consumo de leche evidenció una tendencia ( $p = 0.08$ ), mientras que el consumo de alimento no fue estadísticamente significativo ( $p \geq 0.1$ ).

**Gráfico 1.** Efecto del tiempo sobre la zincemia en terneros (n: 11) inoculados experimentalmente con *Mannheimia haemolytica*.



↓ Inoculación experimental (DÍA 0) con *Mannheimia haemolytica* (6 ml de inóculo con un conteo viable final de  $3 \times 10^8$  UFC/ml).

↓ Tratamiento de los animales clínicamente enfermos (Grado 3) con tilmicosina por vía subcutánea (10 mg/kg de peso vivo).

## DISCUSIÓN

De acuerdo con la hipótesis planteada la infección experimental con MH disminuye la zincemia en terneros. La zincemia es la herramienta diagnóstica con la que se cuenta para evaluar el estatus de Zn en los bovinos (Underwood y Suttle, 1999). La misma se puede ver alterada y modificar el valor dependiendo del estado de salud del animal

(Soltesova et al., 2015). En el presente ensayo se observa una disminución en los valores de zincemia en el día posterior a la inoculación (día 1), momento en que los animales comenzaron con signos de la enfermedad. Los valores más bajos encontrados se registraron en el día 2, en coincidencia con el momento en que todos los terneros alcanzaron criterio de enfermos y se aplicó el tratamiento. Una vez aplicado el tratamiento los valores retornaron, en los días siguientes, a valores considerados dentro del rango de la normalidad ( $> 90 \mu\text{g/dl}$ ). La variabilidad observada de la zincemia, a través del tiempo, es compatible con una función cubica ( $p < 0.001$ ). Los valores de zincemias encontrados en los días 1 y 2 post inoculación experimental se encuentran por debajo de  $80 \mu\text{g/dL}$ , límite inferior del rango marginal indicado en la bibliografía (Enjalbert et al., 2006). En un ensayo realizado por Orr et al. (1990) también observaron disminución de la zincemia 4 días después de una inoculación intranasal con el virus de IBR, momento en el cual se produjo el pico de morbilidad. Estos hallazgos son similares a los observados en el presente ensayo, donde los valores más bajos de zincemia, se encuentran en el momento donde se manifiesta clínicamente la enfermedad. Si bien, no se conoce aún a qué se debe la disminución de la zincemia, se postula que podría tratarse de un mecanismo del hospedador para reducir el nivel de Zn disponible para los microorganismos patógenos, los cuales lo requieren para su proliferación (Liuzzi et al. 2005, Schapiro et al, 2003). Un posible mecanismo sería por la liberación de citoquinas, entre ellas la Interleuquina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) y la Interleuquina 6 (IL-6) que son las responsables del aumento de la transcripción de ARNm del transportador de zinc ZIP14, principalmente en el hígado, el cual introduce el Zn en los hepatocitos, causando la disminución del Zn en sangre (Liuzzi et al., 2005).

En las explotaciones de engorde a corral de Argentina, la ERB es la principal causa de morbi mortalidad en el período de iniciación (Galvan y col. 2014). Tanto el virus de IBR como MH han sido informados ya sea en seguimientos serológicos longitudinales (Streitenberger y col. 2016), como aislamientos y/o detección por técnicas moleculares de casos clínicos de ERB (Fazzio y Landoni 2010-a; Fazzio y col. 2010-b). Tener en cuenta el estado clínico de los animales, al momento de interpretar la zincemia, es de utilidad para quienes realizan monitoreo de las concentraciones minerales en animales en este tipo de explotaciones.

Más ensayos son necesarios para determinar si la variación en las zincemias modifica parámetros productivos, los cuales podrían evitarse con la suplementación del mineral ante los eventos de enfermedad. A su vez, este comportamiento debería ser

considerado al evaluar zincemias en animales con riesgo de infección respiratoria aguda donde la MH pudiera ser en parte el agente causal.

## CONCLUSIONES

La infección experimental con MH disminuye la zincemia en los terneros. Los valores de zincemias en terneros infectados descienden por debajo del rango normal y se recuperan luego del tratamiento antibiótico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aburto-Luna V, Treviño S, Santos-López G, Moroni-González D, Calva-Cruz O, Aguilar-Alonso P, et al. Hepatic mobilization of zinc after an experimental surgery, and its relationship with inflammatory cytokines release, and expression of metallothionein and Zip14 transporter. *Inflamm Res*. 2017; 66(2): 167-175.
2. Aydemir TB, Chang SM, Guthrie GJ, Maki AB, Ryu MS, Karabiyik A, et al. Zinc Transporter ZIP14 Functions in Hepatic Zinc, Iron and Glucose Homeostasis during the Innate Immune Response (Endotoxemia). *PLoS One* 2012; 7(10):e48679.
3. Costa EF, Fazzio LE, Traveria GE, Sanchez RO, Alvarado Pinedo MF, et al. Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la provincia de Buenos Aires. *Rev Med Vet* 2004; 85: 16-22.
4. Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*. 2006; 281(34): 24085-24089.
5. Enjalbert F, Lebreton P, Salat O. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2006; 90(11-12):459-466.
6. Fazzio LE, Landoni MF. Comparación de la eficacia de oxitetraciclina y tilmicosina en el tratamiento metafiláctico de la enfermedad respiratoria bovina en animales de feedlot. *Analecta Vet* 2010-a; vol. 30 n° 02: 35-40.
7. Fazzio LE, Costa EF, Valera AR, Quiroga MA, Galosi CM. Brote de meningoencefalitis por herpes virus bovino tipo 5 en un engorde a corral. VII Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE). Buenos Aires, del 6 al 8 de julio de 2010-b.

8. Galvan WR, Yacachury N, Streitenberger N; Quiroga MA; Fazzio LE. Lesiones anatomopatológicas de bovinos en engorde a corral de un de un de un establecimiento de la provincia de Buenos Aires. Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires 2014.
9. Hanzlicek GA. Epidemiology, diagnosis, and prevention of bovine respiratory disease complex. Mississippi State University. Doctoral Thesis 2010.
10. Kincaid RL, Chew BP, Cronrath JD. Zinc oxide and amino acids as sources of dietary zinc for calves: effects on uptake and immunity. J Dairy Sci 1997; 80(7):1381-1388.
11. King JC, Shames DM, Lowe NM, Woodhouse LR, Sutherland B, Abrams SA, et al . Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men. Am J Clin Nutr. 2001;74:116–124.
12. King JC. Zinc: an essential but elusive nutrient. Am J Clin Nutr. 2011; 94(2):679-684.
13. Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. Annu Rev Nutr. 2009; 29:153-76.
14. Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, et al.. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(19):6843-6848.
15. Orr CL, Hutcheson DP, Grainger RB, Cummins JM, Mock RE. Serum copper, zinc, calcium and phosphorus concentrations of calves stressed by Bovine Respiratory Disease and Infectious Bovine Rhinotracheitis. J Anim Sci 1990; 68:2893-2900.
16. Picco SJ, Anchordoquy JM, De Matos DG, Anchordoquy JP, Seoane A, Mattioli GA, et al. Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. Theriogenology 2010 Oct; 15;74(7):1141-1148.
17. Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev 2007; 8(2); 117–128.
18. Rosa DE, Fazzio LE, Picco SJ, Furnus CC, Mattioli GA. Metabolismo y deficiencia de zinc en bovinos. Analecta Vet 2008; vol. 30 n°2: 34-44.
19. Schapiro JM, Libby SJ, Fang FC. Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(14): 8496-8501.



20. Sekler I, Sensi SL, Hershfinkel M, Silverman WF. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol Med* 2007; 13(7-8):337-343.
21. Soltesova H, Nagyova V, Tothova C, Nagy O. Haematological and blood biochemical alterations associated with respiratory disease in calves. *Acta Vet BRNO* 2015; 84: 249–256.
22. Streitenberger N, Ferella A, Pérez Aguirreburualde MS, Sammarruco A, Dus Santos MJ, Mozgovej M, Maidana S, Romera A, Pecora A, Quiroga MA, Fazzio LE Complejo respiratorio bovino: estudio virológico longitudinal en un establecimiento de engorde a corral de la provincia de Buenos Aires, Argentina. XLIV Jornadas Buiatria; Paysandú, Uruguay 2016.
23. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother* 2003; 57(9):399-411.
24. Underwood and Suttle. *The Mineral Nutrition of Livestock*. CABI Publishing London (UK) 1999; p: 477-512.